

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 813 789**

②1 N° d'enregistrement national : **00 11546**

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 7/48, A 61 K 31/375, A 61 P 17/00 // (A 61 K 31/375, 31:07, 31:70)

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 11.09.00.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 15.03.02 Bulletin 02/11.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INDUSTRIA E COMERCIO DE COSMETICOS NATURA LTDA — BR.

⑦2 Inventeur(s) : ROBERT LADISLAS, ROBERT ALEXANDRE MICHEL, ROBERT CATHERINE SYLVIE et GESZTESI JEAN LUC.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 NOUVELLE COMPOSITION COSMETIQUE OU PHARMACEUTIQUE COMPRENANT UNE ASSOCIATION DE VITAMINE C ET/OU AVEC UN COMPOSANT FUCOSE, ET UTILISATION DE CETTE ASSOCIATION EN COSMETIQUE OU PHARMACIE.

⑤7 La présente invention concerne une nouvelle composition cosmétique ou pharmaceutique caractérisé en ce qu'elle comprend au moins un composant vitamine choisi dans le groupe constitué par la vitamine C et ses dérivés, la vitamine A (ou rétinol) et ses dérivés, et les mélanges de ces ceux-ci, en association avec au moins un composant fucose choisi dans le groupe constitué par le fucose, les polysaccharides et oligosaccharides contenant du fucose, et les mélanges de ces ceux-ci, ainsi qu'au moins un excipient acceptable.

Cette composition permet de réduire significativement, par un véritable effet de synergie, l'effet toxique du composant vitamine et donc d'utiliser dans la composition des tenueurs en composant vitamine supérieures ou égales à celles des produits déjà existant dans le commerce, sans risque pour l'utilisateur.

FR 2 813 789 - A1



Titre : Nouvelle composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant une association de vitamine C et/ou A avec un composant fucose, et utilisation de cette association en cosmétique ou pharmacie.

5 La présente invention concerne une nouvelle composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant une association de vitamine C et/ou A avec un composant fucose, et l'utilisation de cette association notamment dans des produits à application topique, pour lesquels une activité sur le tissu épithelial ou conjonctif est recherchée, en particulier des produits anti-âge, tels que des produits pharmaceutiques ou vétérinaires,  
10 et plus particulièrement, dans des produits cosmétiques.

Le collagène, constituant majeur du derme subit, selon des travaux antérieurs (BRANCHET et al., *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 1991, 13: 1-14), une diminution quantitative avec l'âge. La régulation de sa biosynthèse est donc une étape très importante à considérer pour lutter contre le vieillissement cutané.

15 S'il est bien connu que l'acide ascorbique (ou « vitamine C ») et ses sels (notamment de sodium) possèdent un effets stimulant sur la biosynthèse du collagène, on a pu en revanche mettre en évidence son effet cytotoxique à partir d'une concentration d'environ 0,01 % en poids.

L'effet d'activation de la biosynthèse du collagène, très favorable, est  
20 observable sur des clichés de microscopie électronique, par une forte dilatation des vésicules du réticulum endoplasmique rugueux, remplies de protéines néosynthétisées.

L'effet cytotoxique, défavorable, observable à des concentrations millimolaires d'ascorbate (environ 2,5 mM), se manifeste par le décollement des cellules de leur substrat, le ralentissement de leur prolifération et de la viabilité cellulaire, puis par une  
25 mort cellulaire.

Par ailleurs, le rétinol (ou « vitamine A ») ainsi que d'autres rétinoïdes tel le rétinyl palmitate sont des composés appréciés en particulier dans le domaine des produits cosmétiques pour leurs activités biologiques favorables notamment pour la lutte contre le vieillissement cutané. Ces activités révélées par une utilisation par voie  
30 topique de la vitamine A et de ses dérivés sont présentées par exemple dans l'article de Wade Cheng, PhD et Shirley De Petris, « Vitamin A Complex », Skin Inc, mars/avril 1998.

Toutefois, l'utilisation de la vitamine A pure ou d'un de ses dérivés présente l'inconvénient d'une toxicité telle que l'on doit limiter le dosage ou ajouter des composants notamment pour minimiser l'inconfort de l'irritation de la peau en résultant.

En particulier, il a été signalé que le rétinol induit une inhibition de la  
5 prolifération cellulaire sur des fibroblastes en culture conventionnelle (Lacroix A., Anderson G.D.L., Lippman M.E., « Retinoids and cultured human fibroblasts », Exp Cell Res, 1980, 130: 339-344 ; Harper R.A., Burgoon T., « Differential effects of retinoic acid on the growth of normal fibroblast-like cells in vitro from human, swine and rabbit skin », Cell Biol Int Rep, 1982, 6: 163-170 ; ou encore Stumpfenhausen G.,  
10 Hein R., Kulozik M., Mauch C., Bryce G.F., Oono T., Krieg Th., « The influence of retinoids on fibroblast functions », in Saurat JH ed., Retinoids : 10 years On, 1991, pp. 139-150 Karger, Basel). Il s'agit d'un véritable effet toxique du rétinol sur les fibroblastes.

Les vitamines C et A et les sels et dérivés de ces dernières étant des composants  
15 vitamine très souvent présents notamment dans les produits cosmétiques, en particulier les produits cosmétiques anti-âge, il était donc hautement souhaitable de pouvoir surmonter les inconvénients précités afin de pouvoir accroître les teneurs et donc les effets favorables de ces composants, tout en réduisant leurs effets toxiques.

On a maintenant constaté de manière tout à fait surprenante et inattendue que  
20 l'association de fucose ou d'un polysaccharide ou oligosaccharide contenant du fucose avec la vitamine C et/ou la vitamine A permet de réduire significativement, par un véritable effet de synergie, les effets toxiques de ces vitamines.

La présente invention a ainsi pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique caractérisé en ce qu'elle comprend au moins un composant vitamine  
25 choisi dans le groupe constitué par la vitamine C et ses dérivés, la vitamine A (ou rétinol) et ses dérivés, et les mélanges de ceux-ci, en association avec au moins un composant fucose choisi dans le groupe constitué par le fucose, les polysaccharides et oligosaccharides contenant du fucose, et les mélanges de ceux-ci, ainsi qu'au moins un excipient cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

30 Par « dérivés de la vitamine C », on entend en particulier selon l'invention les sels, tel que le sodium ascorbate, et les esters tels que l'ascorbyl phosphate ou l'ascorbyl palmitate.

Le terme « rétinol » (ou vitamine A) doit être compris comme incluant les isomères hydrogénés et non hydrogénés, tels que les 9-cis-rétinol et didehydrorétinol.

Par « dérivés de la vitamines A », on entend en particulier selon l'invention les rétinoïdes autres que le rétinol, en particulier les esters obtenus avec le rétinol et l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide palmitique ou l'acide stéarique, et plus  
5 particulièrement l'acide rétinoïque, le rétinaldéhyde (ou rétinol) et le rétinyl palmitate.

Le terme « rétinaldéhyde » doit être compris comme incluant les 4 formes stéréoisomères trans, 13-cis, 11-cis et 9-cis.

Le monosaccharide fucose est un déoxyhexose proche du galactose dont il  
10 possède la conformation stérique. Toutefois, la structure du fucose diffère de manière essentielle de celle du galactose en ce que l'atome de carbone-6 comporte un groupe méthyle ( $-CH_3$ ) et non un groupe alcool primaire ( $-CH_2OH$ ). Ce groupe méthyle confère en effet à la molécule du fucose un caractère hydrophobe partiel intéressant, compensé par les autres groupes hydroxyle sur les quatre autres atomes de carbone présents.

15 Le monosaccharide fucose utilisable dans la composition selon l'invention peut être le L-fucose, le D-fucose ou l'un de leurs mélanges. Le L-fucose et le D-fucose peuvent se présenter chacun sous la forme alpha, beta ou d'un mélange de ces formes alpha et beta. Ces produits sont notamment commercialisés par la société SIGMA.

Le fucose apparaît tôt au cours de la phylogenèse, les polysaccharides de  
20 certaines algues et de champignons en contiennent en quantité relativement importante, seul ou en combinaison avec d'autres composés chimiques. Le fucose est par ailleurs répandu dans le règne végétal et certaines bactéries en synthétisent aussi. Le fucose peut également apparaître sous forme sulfatée comme dans les fucanes.

Ainsi, par l'expression « polysaccharides et oligosaccharides contenant du  
25 fucose » on entend tout polysaccharide ou oligosaccharide comprenant au moins une unité fucose, y compris les polysaccharides et oligosaccharides sulfatés « fucanes ».

Les fucanes sont des polysaccharides sulfatés, entrant dans la constitution des parois cellulaires des thalles d'algues brunes (Phéophycées). Ils sont également présents chez certains animaux marins, tels que l'oursin et le concombre de mer. Le fucane brut,  
30 également dénommé fucoïdanes, obtenu par extraction acide à partir des parois cellulaires des thalles d'algues brunes, est constitué d'une population hétérogène de molécules, qui comprend principalement des polymères de L-fucose sulfaté, de masse

molaire moyenne élevée (100 000 à 800 000 g/mol). Des préparations de fucanes de masse molaire moyenne moins élevées (inférieure à 20 000 à 10 000 g/mol, ont été obtenues, par exemple par hydrolyse ménagée de fucane de masse molaire élevée comme décrit dans EP-0 403 377 ou par dépolymérisation radicalaire comme décrit  
5 dans WO 97/08206. On peut citer en particulier le produit dénommé « Fucoidane », commercialisé par la société SIGMA.

Parmi les polysaccharides et oligosaccharides contenant du fucose utilisables dans la composition selon l'invention, autres que les fucanes, on peut citer en particulier ceux commercialisés par la société Solabia, tel que le polysaccharide « Fucogel 1000 ».  
10 La demande WO 96/23057 décrit le procédé de préparation d'un tel polysaccharide, comprenant le motif de répétition fucose-galactose-acide galacturonique.

Nous avons par ailleurs découvert un nouveau mélange d'oligosaccharides contenant du fucose, ci-après dénommé « Mélange d'oligofucoses » particulièrement approprié pour la présente invention.

15 Il s'agit d'un mélange d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose, caractérisé en ce qu'il comprend des oligosaccharides de moins de 13 unités saccharidiques comprenant au moins une unité fucose en position terminale non réductrice, et en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant au moins une étape de dégradation d'un polysaccharide issu d'un microorganisme du genre  
20 *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*.

Par "oligosaccharide non sulfaté à base de fucose" on entend selon l'invention, en accord avec les connaissances générales de l'homme du métier, un oligosaccharide contenant au moins une unité saccharidique fucose et ne comportant pas de groupe sulfate  $-O(SO_3)^-$ . Les fucanes sont en particulier exclus de cette définition.

25 Par "oligosaccharide comprenant au moins une unité fucose en position terminale non réductrice" on entend selon l'invention, en accord avec les connaissances générales de l'homme du métier, un oligosaccharide contenant au moins une unité saccharidique fucose en position terminale de la chaîne de l'oligosaccharide, cette unité fucose étant reliée à l'unité saccharidique suivante du reste de l'oligosaccharide par une  
30 liaison de type acétal.

Les nombres d'unités saccharidiques peuvent être mesurées à l'aide de techniques bien connues de l'homme du métier, en particulier en utilisant la technique de chromatographie HPLC telle que celle décrite dans les exemples ci-après.

De préférence, le Mélange d'oligofucoses comprend, par rapport au poids total  
5 du mélange, au moins 15 % en poids, et plus particulièrement de préférence de 20 à 50 % en poids, d'oligosaccharides de moins de 13 unités saccharidiques comprenant au moins une unité fucose en position terminale non réductrice.

Plus particulièrement, le Mélange d'oligofucoses est caractérisé en ce qu'il comprend en outre, par rapport au poids total du mélange, de 25 à 45 % en poids  
10 d'oligosaccharides ayant de 13 à 24 unités saccharidiques comprenant au moins une unité fucose en position terminale non réductrice.

Plus particulièrement encore, le Mélange d'oligofucoses est caractérisé en ce qu'il comprend en outre, par rapport au poids total du mélange, de 15 à 35 % en poids d'oligosaccharides de plus de 54 unités saccharidiques comprenant au moins une unité  
15 fucose en position terminale non réductrice.

Le Mélange d'oligofucoses étant susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant au moins une étape de dégradation d'un polysaccharide issu d'un microorganisme du genre *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, les oligosaccharides comprennent de préférence, au moins en partie, le motif de répétition  
20 fucose-galactose-acide galacturonique.

En particulier, le Mélange d'oligofucoses est susceptible d'être obtenu par le procédé comprenant les étapes consistant à :

- a) faire croître le microorganisme du genre *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* dans un milieu nutritif aqueux par fermentation aérobie d'une  
25 source de glucide assimilable;
- b) récupérer le polysaccharide formé à partir du moût de fermentation;
- c) soumettre le polysaccharide à une hydrolyse modérée;
- d) soumettre le produit d'hydrolyse de l'étape c) à une hydrolyse enzymatique; et
- 30 e) désactiver l'enzyme puis récupérer le Mélange d'oligofucoses ainsi formé.

Plus particulièrement, ces étapes a) à e) peuvent être décrites de la manière suivante.

Etape a)

On utilise de préférence le microorganisme *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* est le microorganisme déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes sous le numéro I-1507, ou un mutant de ce dernier. Ce microorganisme est par ailleurs décrit en détails dans la demande WO 96/23057.

Le milieu nutritif aqueux peut être tout milieu aqueux connu de l'homme du métier, contenant des sources de carbone, d'azote et des sels minéraux tels que ceux décrits dans la demande WO 96/23057.

On peut conduire la fermentation à des températures de l'ordre de 25 à 35 °C, à un pH d'environ 6,0 à 7,5, dans des conditions d'aération et d'agitation, pendant des durées de l'ordre de 2 à 4 jours.

La fermentation peut être effectuée dans un fermenteur classique en inoculant du milieu nutritif préalablement stérilisé, par exemple par chauffage à une température de l'ordre de 120 °C ou par filtration stérilisante.

Etape b)

A la fin de la période de fermentation, on récupère le moût de fermentation duquel on isole un polysaccharide riche en fucose de la manière suivante.

On soumet le moût de fermentation à un traitement thermique à une température notamment comprise entre environ 100 et environ 130 °C, de préférence entre environ 115 et environ 125 °C pendant un temps notamment d'environ 30 minutes à environ 2 heures et de préférence d'environ 40 minutes à environ 1 heure et à un pH notamment compris entre environ 2 et environ 5,5 et de préférence entre environ 3 et environ 5,5.

Le produit du traitement thermique est filtré selon des moyens classiques tels qu'une filtre presse avec plaques.

On obtient ainsi un polysaccharide limpide, visqueux et exempt de toute cellule.

On réalise ensuite une précipitation dans un solvant alcool, de préférence un solvant alcool choisi parmi l'éthanol, l'isopropanol et les mélanges de ces derniers. On utilise en particulier environ 1 à environ 3,0 volume de solvant pour 1 volume de polysaccharide et de préférence environ 1,3 à environ 2,0 volume de solvant pour 1 volume de polysaccharide.

On effectue ensuite un séchage sous vide à une température notamment comprise entre environ 20 et environ 60 °C et de préférence entre environ 30 et environ 50 °C, jusqu'à obtention d'une poudre.

5        Etapas c) et d) : hydrolyse du polysaccharide

Il s'agit d'une combinaison d'étapes essentielle. On a en effet constaté de manière surprenante et inattendue que la combinaison d'une étape d'hydrolyse modérée, de préférence par irradiation aux rayons gamma et/ou par protolyse, avec une étape d'hydrolyse enzymatique, permet d'obtenir avantageusement un rendement global d'hydrolyse suffisant, proche de celui d'une hydrolyse classique telle qu'une hydrolyse acide, mais avec l'avantage de coupures spécifiques d'une hydrolyse enzymatique. En particulier, une hydrolyse classique acide ne permet pas d'obtenir le Mélange d'oligofucoses spécifiques dans la mesure où elle conduit à l'obtention de coupures statistiques, rédhitoires quant à leur caractère aléatoire. Les composés résultant d'une hydrolyse acide classique se sont d'ailleurs révélés biologiquement inactifs.

15        Etape c) : hydrolyse modérée du polysaccharide

L'hydrolyse modérée est réalisée par un traitement au rayons gamma, un traitement de protolyse ou par ces deux traitements successifs. De préférence, on réalise successivement un traitement au rayons gamma puis un traitement de protolyse.

20        Le traitement par les rayons gamma s'avère provoquer une baisse sensible de la viscosité de par une dégradation limitée, attribuable à l'action de radicaux libres. Il peut être réalisé avec des moyens d'irradiation bien connus de l'homme du métier.

Ce traitement par des rayons gamma, rayons très pénétrants, présente en outre l'avantage de stériliser le polysaccharide en tuant les germes présents qui pourraient induire une inflammation ou même provoquer un granulome. On prévient ainsi toute attaque bactérienne sans devoir ajouter au milieu des produits antiseptiques qui eux pourraient interférer de manière indésirable avec les activités biologiques du produit final.

30        La poudre de polysaccharide obtenue à l'étape b), éventuellement irradiée aux rayons gamma, peut donc également être soumise à un traitement de protolyse. Elle est pour cela mise en solution aqueuse à raison notamment de 1 à 20 % en poids et de préférence de 2 à 10 % en poids, par rapport au poids total de la solution aqueuse.



La solution aqueuse est soumise à un traitement thermique, c'est à dire à un chauffage à une température notamment comprise entre environ 75 et environ 120 °C et de préférence entre environ 90 et environ 100 °C, pendant un temps notamment compris entre 1 et 6 heures, en présence d'une résine génératrice de protons telles que celles commercialisée et bien connues de l'homme du métier, c'est à dire une résine générant des protons qui entraînent une coupure des liaisons glycosidiques avec fixation d'une molécule d'eau.

Etape d) : hydrolyse enzymatique

On introduit un tampon acide tel que le tampon acide citrique (4,15 g/kg)–hydrogénophosphate disodique (environ 10,75 g/kg) dans l'hydrolysats obtenu à l'étape b). On règle la température de la solution à une température notamment comprise entre environ 25 et environ 45 °C et de préférence entre environ 30 et environ 40 °C.

On introduit une préparation enzymatique comprenant au moins une endo-fucosidase, de préférence la Fermizyme HCP telle que commercialisée par la société Gist Brocades, selon une teneur notamment comprise entre environ 2 et environ 20 % en poids, et de préférence entre environ 5 et environ 15 % en poids, par rapport au poids initial de poudre de polysaccharide utilisée.

Le mélange ainsi obtenu est maintenu sous agitation pendant un temps notamment compris entre environ 8 et environ 24 heures et de préférence entre environ 10 et environ 20 heures, à une température notamment comprise entre environ 25 et environ 45 °C et de préférence comprise entre environ 30 et environ 40 °C, le pH étant réglé à 6 par la présence du mélange tampon.

Etape e)

Le produit d'hydrolyse obtenu à l'issue de l'étape d) est filtré selon des moyens classiques tels qu'une filtre presse avec plaques.

La solution recueillie est ensuite traitée thermiquement à une température notamment comprise entre environ 75 et environ 120 °C et de préférence entre environ 90 et environ 105 °C, pendant un temps notamment compris entre environ 10 et environ 45 minutes et de préférence entre environ 20 et environ 35 minutes, afin de désactiver l'enzyme et plus particulièrement l'activité fucosidase de cette enzyme spécifique.

On laisse refroidir à une température notamment comprise entre environ 20 et environ 40 °C .

Lors du refroidissement, des conservateurs peuvent être ajoutés à la solution.

On filtre ensuite l'ensemble dans des conditions stériles puis on réalise le conditionnement.

Le Mélange d'oligofucoses ainsi obtenu peut être caractérisé à l'aide de techniques bien connues de l'homme du métier notamment par HPLC, chromatographie sur couche mince et autres méthodes et dosages chimiques.

On peut ainsi constater que les oligosaccharides du Mélange d'oligofucoses sont tels que le fucose se retrouve majoritairement en bout de chaîne, en position terminale non réductrice.

Les effets favorables de la composition selon l'invention se manifestent à des concentrations faibles de composant fucose, de préférence à une concentration comprise entre environ 0,001 et environ 20 % en poids, et plus particulièrement de préférence entre environ 0,01 et environ 10 % en poids, la concentration en composant vitamine étant de préférence comprise entre environ 0,001 et environ 90 % en poids, et plus particulièrement de préférence entre environ 0,1 et environ 10 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

En choisissant d'une façon adéquate les concentrations respectives du composant vitamine et du composant fucose, il est ainsi possible de réduire significativement, voire de supprimer l'effet toxique du composant vitamine et donc d'utiliser dans la composition selon l'invention des teneurs en composant vitamine supérieures ou égales à celles des produits déjà existant dans le commerce, sans risque pour l'utilisateur.

De préférence, le rapport pondéral composant vitamine : composant fucose est compris entre environ 800 : 1 et environ 1 : 2 et plus particulièrement de préférence entre environ 600 : 1 et environ 1 : 1.

L'excipient cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable peut être tout excipient parmi ceux connus de l'homme du métier en vue d'obtenir une composition selon l'invention sous forme d'une crème, d'une lotion, d'un gel, d'une pommade, etc, éventuellement sous la forme d'une émulsion avec en outre des composants connus de l'homme du métier, pour améliorer, modifier ou stabiliser la composition d'un point de vue cosmétique ou cosmétique.

L'expression « excipient pharmaceutiquement acceptable » englobe les excipients adaptés à un usage vétérinaire de la composition selon l'invention.

La composition selon l'invention peut en particulier contenir d'autres additifs et aides à la formulation, tels que des agents antioxydants pour combattre les radicaux  
5 libres. On peut citer notamment la vitamine E pure ou le di-alpha- tocophérol et ses dérivés , et le 2,6-di-ter-buthyl-p-cresol (BHT).

Selon un mode de réalisation particulier de la présente invention, la composition comprend en outre un vecteur, tel que des microsphères renfermant en particulier le composant vitamine, comme par exemple les « Talasphères » décrites dans US-5 395  
10 620 ou dans notre demande de brevet PI 9706994-7.

La composition selon l'invention peut ainsi par exemple comprendre une pluralité de microsphères, dispersées, comprenant un premier composant vitamine C dans un premier groupe de microsphères et un deuxième composant vitamine A dans un deuxième groupe de microsphères, le composant fucose étant à l'extérieur des  
15 microsphères, dans le reste de la composition. Bien entendu, une variante de ce mode de réalisation peut consister en ce que le composant vitamine C et/ ou A soit compris dans un seul groupe de microsphères.

Avantageusement, la composition selon l'invention peut en particulier comprendre en outre au moins un additif cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable, choisi dans le groupe constitué par les agents structurants de la peau (tels  
20 que le squalane et les sphigolipides), les agents humectants (tels que la glycérine et l'hydroxy prosilan C), les émoullients (tels que le buthylène glycol et le lactate de céthyle), les silicones (telles que la cyclométhicone), les agents de protection solaires (tels que les Parsol 1789 et Eusolex 6300), les émulsifiants (notamment le Carbopol  
25 1342 associé à la triéthanolamine et la lécithine de soja), les épaississants (notamment la gomme de xanthane), les agents séquestrants (notamment l'EDTA), les antioxydants (tels que le BHT décrit ci-dessus) les fragrances, les conservateurs, et les mélanges de ceux-ci.

Bien entendu, les conditions opératoires pour préparer la composition selon  
30 l'invention font parties des connaissances générales de l'homme du métier.

La présente invention a encore pour objet l'utilisation, dans une composition cosmétique ou pharmaceutique, d'au moins un composant vitamine tel que défini ci-

dessus en association avec au moins un composant fucose tel que défini ci-dessus, pour réduire les effets toxiques du composant vitamine.

De préférence, on utilise un rapport pondéral composant vitamine : composant fucose est compris entre environ 800 : 1 et environ 1 : 2 et plus particulièrement de  
5 préférence entre environ 600 : 1 et environ 1 : 1 .

Enfin, la présente invention a encore pour objet une méthode pour le traitement cosmétique ou pharmaceutique de la peau, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau une composition cosmétique ou pharmaceutique telle que définie ci-dessus.

En particulier, la présente invention a pour objet une méthode de traitement  
10 cosmétique de la peau, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau une composition cosmétique telle que définie ci-dessus.

Les exemples ci-après illustrent une véritable synergie entre le fucose, les oligosaccharides à fucose avec le rétinol et l'ascorbate et justifient leur association notamment dans une préparation " anti-vieillessement " cosmétologique.

15 Les exemples suivants ne sont toutefois destinés qu'à illustrer la présente invention et ne doivent en aucun cas être interprétés comme pouvant en limiter la portée.

La Figure 1 est un histogramme reportant les résultats présentés à l'exemple 4.b.1, en termes de pourcentage d'efficacité du fucose et du Mélange d'oligofucoses-1  
20 pour la stimulation de la synthèse de collagène par les fibroblastes.

La Figure 2 est un histogramme reportant les résultats présentés à l'exemple 4.b.2, en termes de pourcentage d'efficacité du fucose et du Mélange d'oligofucoses-1 pour la stimulation de la biosynthèse de collagène par les fibroblastes en présence d'ascorbate de sodium.

25 La Figure 3 est un histogramme reportant les résultats présentés à l'exemple 4.b.3, en termes de pourcentage d'efficacité du fucose et du Mélange d'oligofucoses-1 pour la stimulation de la synthèse du collagène en présence de rétinol.

**Exemple 1 : préparation d'un Mélange d'oligofucoses****a) Fermentation**

- On utilise le microorganisme *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* est le
- 5 microorganisme déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes sous le numéro I-1507. Le milieu nutritif et autres conditions de la fermentation sont les suivants.

**Préparation des inoculums**

- 10 Milieu de culture :
- Néosorb® 70-07 (teneur en sorbitol : 70 % M.S.;
- Vendu par ROQUETTE FRERES, Lille / France): 17,90 g/l (soit 12,5 g/l de sorbitol)
- Peptone Biokar 104003 (hydrolysate de protéines,
- vendu par SOLABIA-BIOKAR, Pantin, France) : 4,50 g/l
- 15 Extrait de levure : 0,05 g/l
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1,50 g/l
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 4,50 g/l
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,20 g/l
- Pluronic® PE 61000 (agent anti-mousse,
- 20 Vendu par BASF, D-6700 Ludwigshafen,
- Allemagne) : 0,50 g/l
- Mise en solution dans de l'eau.
- Condition de culture :
- Stérilisation à 121°C pendant 30 minutes
- 25 Température de culture : 30°C
- Taux d'inoculation : 5 à 10 %
- Aération : 1 VVM
- PH non régulé (pH d'environ 7,00)
- Durée de culture : 24 heures

30

**Milieu de production**

- Milieu de culture :
- Néosorb® 70-07 : 54,00 g/l (soit 38g/l de sorbitol)
- Peptone Biokar ®b 104003 : 4,50 g/l
- 35 Extrait de levure : 0,05 g/l
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1,50 g/l

MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O : 0,20 g/l

Pluronic ® PE 61000 : 0,50 g/l

Mise en solution dans de l'eau.

Conditions de culture (Fermenteur Chemap ayant un volume utile de 350 litres) :

5 Stérilisation à 120°C pendant 45 minutes

Température de culture : 30°C

Taux d'inoculation : environ 5 %

Agitation : 300 rpm (agitateur de type Rushton)

Aération : 1 VVM

10 PH réglé à 7,0 par NaOH 7 N

Pression : 100 à 200 mbars

Durée de culture : 60 à 65 heures

Valeurs moyennes obtenues en production :

Viscosité en fin de cycle : : 40000 Mpa.s (Viscosimètres Brookfield DV-II+  
modèle LV, mobile SP 31, chambre SC4-34/13R, 30°C)

Concentration du polysaccharide produit

dans le milieu, calculée en L-fucose : 2 g/l (méthode de Dische et Shettles)

Sorbitol consommé : > 35 g/l (en sorbitol)

NaOH à 20% en poids consommée : 15 litres/m<sup>3</sup>

20 Début de régulation du pH : 16 à 17 heures après inoculation du fermenteur

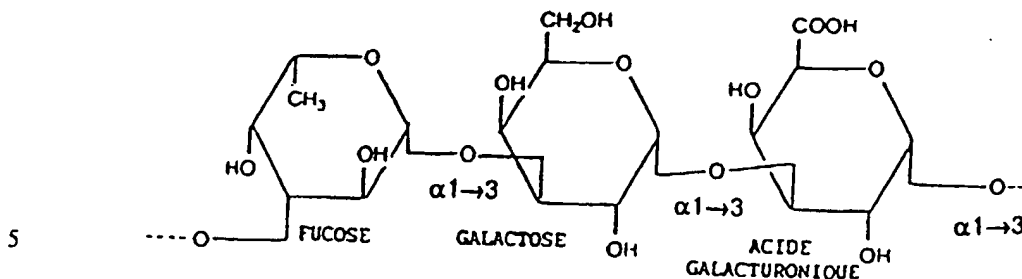
Extrait sec final du milieu de fermentation

: ~20 g/l

### b) Récupération du polysaccharide formé

25 On soumet le moût de fermentation à un traitement thermique à une température de 120 °C pendant 45 minutes et à un pH de 5,5. Le produit du traitement thermique est filtré à l'aide d'une filtre presse avec plaques type Seitz. On obtient ainsi un polysaccharide limpide, visqueux et exempt de toute cellule. On réalise ensuite une précipitation dans un 1,5 volume d'éthanol pour 1 volume de polysaccharide. On effectue ensuite un séchage sous vide à une température de 25 °C jusqu'à obtention d'une poudre. Compte tenu du microorganisme utilisé, ce polysaccharide est composé, d'unités répétitives trisaccharidiques fucose -galactose- acide galacturonique, et présente ainsi la structure suivante :

30



### c) Hydrolyse modérée du polysaccharide

La poudre de polysaccharide est mise en solution aqueuse à raison de 5 % en poids, par rapport au poids total de la solution aqueuse. La solution aqueuse est soumise à un traitement thermique, c'est à dire à un chauffage à 100 °C, pendant 3 heures, en présence d'une résine génératrice de protons.

10

### d) Hydrolyse enzymatique

On introduit le mélange tampon acide citrique (4,15 g/kg)–hydrogénophosphate disodique (environ 10,75 g/kg) dans l'hydrolysats. On règle la température de la solution à 37 °C. On introduit la préparation enzymatique Fermizyme HCP telle que commercialisée par la société Gist Brocades, selon une teneur de 10 % en poids, par rapport au poids initial de poudre de polysaccharide utilisée, c'est à dire 0,05% en poids par rapport à la masse totale de la solution aqueuse après remise en eau de la poudre comme décrit ci-dessus pour l'hydrolyse modérée par protolyse.

15

20

Le mélange ainsi obtenu est maintenu sous agitation pendant 15 heures à une température de 37 °C, le pH étant réglé à 6 par la présence du mélange tampon.

### e) Désactivation de l'enzyme et récupération du mélange d'oligosaccharides

Le produit d'hydrolyse est filtré avec une filtre presse avec plaques type Seitz. La solution recueillie est ensuite traitée thermiquement à 100 °C pendant 30 minutes, pour désactiver l'enzyme. On laisse refroidir à une température de 25°C. Lors du refroidissement, les conservateurs phénoxy éthanol (1% en poids) et phénonip (0,3 % en poids) sont ajoutés à la solution. On filtre ensuite l'ensemble dans des conditions stériles.

25

30

Le mélange d'oligosaccharides ainsi obtenu est dénommé "Mélange d'oligofucoses-1".

**Exemple 2 : caractérisation HPLC du Mélange d'oligofucoses-1**

Le fractionnement du Mélange d'oligofucoses-1 obtenu à l'exemple 1 a été réalisé dans le dessin de déterminer la proportion d'oligo- et polysaccharides dans sa composition.

a) **Fractionnement par chromatographie d'exclusion préparative sur la colonne "Xk 50/60 Superdex 75 prepgrade"**

Nous avons passé 50ml du Mélange d'oligofucoses-1 concentré à 50mg/ml, sur une colonne préparative "XK 50/60 Superdex 75 prepgrade" (chromatographie d'exclusion) et nous avons collecté 95 fractions, passées ensuite en HPLC.

**Tableau 1 : Informations techniques concernant la colonne préparative**

**XK 50/60 Superdex 75 prepgrade**

<b>Remplissage</b>	Superdex 75 prepgrade (34 µm)
<b>Taille de la colonne</b>	Hauteur : 50 cm Diamètre : 60 mm
<b>Type de colonne</b>	XK 50/60
<b>Intervalle utilisable de fractionnement</b>	$5 \times 10^2$ Da – $3 \times 10^4$ Da
<b>Échantillon injecté :</b>	50 ml du Mélange d'oligofucoses-1 à la concentration de 50 mg/ml. (au total : = 2,50 g)
<b>Vitesse d'élution</b>	1 ml/ minute
<b>Nombre de fractions collectées</b>	95 fractions de 12,5 ml chacune
<b>Phase mobile</b>	PBS



Après fractionnement du Mélange d'oligofucoses-1 sur la colonne "XK 50/60 Superdex 75 prepgrade, on recueille 95 fractions dont 45 contiennent des osides.

**b) Caractérisation des fractions obtenues par HPLC (chromatographie d'exclusion) colonnes ultrahydrogel 120 et ultrahydrogel 250**

L'objectif de cette deuxième partie de notre étude était de passer sur une colonne d'exclusion HPLC (colonnes Ultrahydrogel 120 et 250) toutes les 95 fractions du Mélange d'oligofucoses-1 pour analyser les poids moléculaires et la concentration des composants de ces fractions.

Nous avons travaillé pour cette étude avec un système HPLC de Waters dont la description suit.

**Tableau 2 : caractéristiques techniques du système de chromatographie HPLC utilisé**

<b>Appareil</b>	HPLC Waters 600
<b>Colonnes</b>	Ultrahydrogel 120 (taille de pores : 120 Å) et Ultrahydrogel 250 (taille de pores : 250 Å) de Waters. Taille : 7,8 mm x 300 mm, contenant le gel de polymétacrylate hydroxylé
<b>Échantillons injectés</b>	20 µl par injecteur automatique
<b>Élution Temps de l'élution</b>	0,10 M NaNO <sub>3</sub> 50 minutes/ échantillons
<b>Vitesse de l'élution</b>	0,5 ml/ minute.
<b>Détection</b>	Par mesure de l'indice de réfraction avec un réfractomètre Waters 410.

**Tableau 3 : standards de poids moléculaires de polyéthylène glycol (Fluka)**  
**utilisés pour la chromatographie d'exclusion par HPLC**

<b>Poids moléculaire</b>	<b><i>TEMPS D'ELUTION (MINUTES)</i></b>
400	37,892
600	36,026
1000	33,940
2000	31,154
4000	28,896
6000	27,868
8000	26,946
12000	26,192
20000	25,308
35000	24,216

5

### c) Résultats

Les poids moléculaires des composants des fractions étudiées ont été calculés en utilisant l'équation suivante, obtenue avec les standards de poids moléculaire de Fluka décrits au tableau 3 :

10

$$\text{Poids moléculaire des composants} = 55290000 * 10^{(-0,13942 * x)} \quad R^2=0,982$$

x = temps d'élution (minutes)

La première fraction contenant des composants du Mélange d'oligofucoses-1 est la fraction n°44 et la dernière est la fraction n°89, ce qui veut dire que même le composant du poids moléculaire le moins élevé est sorti après 89 fractions recueillies (après une élution de  $89 \times 12,5 \text{ ml} = 1112,5 \text{ ml}$ ). Les fractions recueillies contiennent  
5 des mono-, oligo- et polysaccharides de 184Da (mélange de monosaccharides) jusqu'à environ 21kDa. Cette dernière fraction contient donc des polysaccharides composés en moyenne de 117 unités monosaccharidiques ou de 39 unités trisaccharidiques.

La majorité des fractions, exceptées les fractions n°77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85 et 86, contiennent un seul pic saccharidique (séparation limitée par la sensibilité de la  
10 méthode de séparation utilisée).

La concentration approximative des composants des différentes fractions a pu être déterminée en utilisant une gamme d'étalon de fucose aux concentrations croissantes. Cette sorte de gamme étalon "mono-compositionnelle" a pu être utilisée grâce au système de détection (mesure de l'indice de réfraction avec un réfractomètre).  
15 Selon ces résultats, une solution de  $1 \mu\text{g/ml}$  de fucose donne en moyenne un pic de surface 29409 (unités arbitraires du système). En connaissant les surfaces des pics analysés, nous avons donc pu calculer leurs concentrations apparentes.

Les résultats obtenus montrent que le Mélange d'oligofucoses-1 contient environ 26% de petits osides (jusqu'à 2Kda, environ 4 unités trisaccharidiques), environ  
20 36% d'oligosaccharides (jusqu'à 4Kda, 8 unités trisaccharidiques) et environ 23% de polysaccharides de poids moléculaire supérieur à 10kDa (18 unités trisaccharidiques).

Compte tenu du microorganisme et de l'enzyme spécifique (endo-fucosidase) utilisés pour la préparation du Mélange d'oligofucoses-1, il apparaît que les oligosaccharides du Mélange d'oligofucose-1 comportent une unité fucose en position  
25 terminale non réductrice.

### **Exemple 3 : action de l'association du Mélange d'oligofucoses-1 avec l'ascorbate de sodium et/ou le rétinol, sur les fibroblastes de peau humaine**

30 Le Mélange d'oligofucoses-1 tel que préparé à l'exemple 1 est testé aux concentrations de  $1 \mu\text{g/ml}$  et  $10 \mu\text{g/ml}$ , seul ainsi qu'en présence simultanée de  $375 \mu\text{g/ml}$  d'ascorbate de sodium et/ou de  $20 \mu\text{g/ml}$  de rétinol.

## **a) Méthodologie**

### **a.1) Etude de la prolifération cellulaire**

Les fibroblastes de peau humaine utilisés dans cette étude proviennent d'un  
5 prélèvement cutané d'une femme de 20 ans (28<sup>ème</sup> passage). Les cellules ont été  
cultivées dans des plaques de 12 puits, dans un milieu de culture DMEM avec 10 % de  
sérum de veau foetal (SVF), 1 % d'antibiotiques et d'antifongiques (PSF), et 1  $\mu$ Ci/ml de  
[<sup>3</sup>H]-thymidine (ICN) pendant 72 heures en présence des produits à tester dans les  
concentrations finales de 1  $\mu$ g/ml et 10  $\mu$ g/ml.

10 Après 72 heures de culture en étuve (5% (v/v) CO<sub>2</sub>, 95% (v/v) air) à 37°C en  
présence des produits testés, les cellules ont été lavées quatre fois avec du PBS, puis le  
tapis cellulaire détaché par 0,05% de trypsine. Trois ml de liquide de scintillation sont  
ensuite ajoutés par échantillon, puis la radioactivité incorporée dans les cellules est lue  
dans un compteur à scintillation.

15

### **a.2) Synergie avec le rétinol**

Nous avons incubé les cellules avec 20 $\mu$ g/ml de rétinol (69,72 $\mu$ M). Le rétinol  
induit, en absence des oligosaccharides, une baisse de la prolifération cellulaire  
d'environ 45% (tableau 2 ci-après). Deux concentrations ont été testées : 1  $\mu$ g/ml et 10  
20  $\mu$ g/ml.

### **a.3) Etude de la synergie avec l'ascorbate de Na**

Nous avons incubé les cellules avec 375 $\mu$ g/ml d'ascorbate de Na (1,875mM). La  
vitamine C induit, en absence de fucose ou du Mélange d'oligofucoses-1, une  
25 diminution de la prolifération cellulaire d'environ 60% (tableau 3 ci-après). Deux  
concentrations ont été testées : 1  $\mu$ g/ml et 10  $\mu$ g/ml.

### **a.4) Synergie avec l'ascorbate de Na et le rétinol**

Les cellules ont été incubées simultanément avec 375  $\mu$ g/ml d'ascorbate de Na et  
30 20  $\mu$ g/ml de rétinol. Cette combinaison produit une forte inhibition de la prolifération,  
partiellement levée par les produits testés.

**b) Résultats****b.1) Action sur la prolifération cellulaire**

L'incubation de 72 heures des fibroblastes avec le Mélange d'oligofucoses-1 a stimulé la prolifération cellulaire par comparaison avec les cellules non traitées (tableau 1 ci-après).

**b.2) Synergie avec le rétinol**

L'incubation de 72 heures des fibroblastes avec 20 µg/ml de rétinol a provoqué une diminution de 42,5% de la prolifération cellulaire (tableau 2 ci-après) par rapport au témoin sans rétinol.

En présence de 20 µg/ml de rétinol et de différentes concentrations du produit testés, ajoutés simultanément aux milieux de culture des fibroblastes, la prolifération cellulaire est significativement plus élevée qu'en présence de 20µg/ml de rétinol seul. Il s'agit d'un effet protecteur témoignant d'une synergie entre le rétinol et le Mélange d'oligofucoses-1.

1 µg/ml et 10 µg/ml du Mélange d'oligofucoses-1 ont augmenté d'une façon significative la prolifération cellulaire (+ 24 % et + 27 %, respectivement) par rapport au témoin (20 µg/ml de rétinol seul, tableau 2 ci-après).

**b.3) Synergie avec l'ascorbate de Na**

72 heures d'incubation des fibroblastes avec 375 µg/ml (1,875 mM) d'ascorbate de Na ont diminué l'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-thymidine, donc la prolifération cellulaire, d'environ 36 % par rapport au contrôle (tableau 3 ci-après).

En présence simultanée de 375 µg/ml d'ascorbate de Na et de différentes concentrations du produit testé, la prolifération cellulaire des fibroblastes a augmenté d'une façon significative par rapport à l'ascorbate seul (tableau 3 ci-après). Le Mélange d'oligofucoses-1 est efficace aussi bien à 1 et 10µg/ml.

**b.4) Synergie avec l'ascorbate de Na et le rétinol**

En présence simultanée de 375 µg/ml d'ascorbate de Na et de 20 µg/ml de rétinol, la prolifération cellulaire des fibroblastes diminue d'environ 88% par rapport à l'ascorbate seul (tableau 4 ci-après).

**TABEAU 4 : EFFET DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS DU MÉLANGE D'OLIGOFUCOSES-1 SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DES FIBROBLASTES DE PEAU HUMAINE (PROLIFERATION PAR RAPPORT AU CONTRÔLE)**

Produit	Concentration	Efficacité rapport contrôle	Sign. statistique (p par rapport au contrôle)
Contrôle			
Mélange d'oligofucoses-1	1 µg/ml	+4,4	N.S.
Mélange d'oligofucoses-1	10 µg/ml	+20,6	* 0,019

5

**TABEAU 5 : Effet des différentes concentrations du Mélange d'oligofucoses-1 sur la cytotoxicité de 20 µg/ml de rétinol (prolifération par rapport au contrôle et par rapport au 20 µg/ml de rétinol)**

Traitement	Concentration	% vs. 20 µg/ml de rétinol	% vs. Contrôle	Sign. statistique (p vs. rétinol)	Sign. statistique (Pvs contrôle)
Rétinol	20 µg/ml		-42,5		0,019
Mélange d'oligofucoses-1 + ascorbate 375 µg/ml	1 µg/ml	+ 24,2	-29,3	* 0,047	58
Mélange d'oligofucoses-1 + ascorbate 375 µg/ml	10 µg/ml	+ 26,9	-27,1	* 0,046	54

10 **TABEAU 6 : Effet des différentes concentrations du Mélange d'oligofucoses-1 sur la cytotoxicité de 375 µg/ml d'ascorbate de Na (prolifération par rapport au contrôle et par rapport au 375 µg/ml d'ascorbate)**

Traitement	Concentration	% vs. 375 µg/ml d'ascorbate	% vs. contrôle	Sign. statistique (pvs. ascorbate)	Sign. statistique (pvs. contrôle)
Ascorbate de Na	375 µg/ml		-64,4		05
Mélange d'oligofucoses-1 + ascorbate 375 µg/ml	1 µg/ml	+ 96,9	- 30,0	** 0,003	51
Mélange d'oligofucoses-1 + ascorbate 375 µg/ml	10 µg/ml	+ 80,8	- 35,7	* 0,015	33

**TABLEAU 7 : Effet des différentes concentrations du Mélange d'oligofucoses-1 sur la cytotoxicité de 375 µg/ml d'ascorbate de Na et de 20 µg/ml de rétinol (prolifération par rapport au contrôle et par rapport au 375 µg/ml d'ascorbate + 20 µg/ml de rétinol)**

Traitement	Concentration	% vs. ascorbate + rétinol	% vs. contrôle	Sign. statistique (p vs. +rétinol +ascorbate)	Sign. statistique (pvs. contrôle)
Ascorbate de Na	375 µg/ml		-64,4		05
Rétinol	20 µg/ml		-42,5		19
Ascorbate de Na + rétinol	375 µg/ml + 20 µg/ml		- 87,54		03
Mélange d'oligofucoses-1 + ascorbate 375 µg/ml	1 µg/ml	+95,2	- 75,7	* 0,010	04
Mélange d'oligofucoses-1 + ascorbate 375 µg/ml	10 µg/ml	+102,8	-74,7	** 0,007	04

**Exemple 4 : effet du fucose et du Mélange d'oligofucoses-1 en présence d'ascorbate de sodium et/ou de rétinol**

Nous avons étudié l'influence du fucose et du Mélange d'oligofucoses-1, tel que préparé à l'exemple 1, sur l'effet cytoxique de l'ascorbate de sodium ainsi que l'influence de ces deux composants fucose sur l'effet du rétinol.

**a) Méthodologie**

Les fibroblastes de plastie mammaire d'une femme de 45 ans, au passage 14 ont étéensemencés dans les plaques de 12 puits à raison de 0,5. 10<sup>5</sup> cellules par puits. Les cellules sont mises en culture pendant 48 heures en présence du milieu de culture DMEM à 10% de serum de veau fœtal (SVF), à l' étuve (5 % (v/v) CO<sub>2</sub>, 95% (v/v) air) à 37°C.

Après un rinçage au PBS, elles sont traitées et remises en culture pendant 48 heures en présence de produits à tester et du DMEM sans SVF.

La méthode est basée sur une coloration spécifique du collagène par le rouge Sirius. Les cellules sont fixées directement par le liquide de Bouin (1ml/puits) pendant 1  
5 heure, après un rinçage exhaustif au PBS. Le fixateur est ensuite aspiré et les plaques sont rincées à l'eau courante par immersion pendant 15 minutes.

La coloration se fait sous agitation pendant 1 heure (1ml/puits) et les plaques sont ensuite rincées à l'acide chlorhydrique 0,01N. Le matériel est ensuite dissout dans 200  $\mu$ l d'hydroxyde de sodium 0,1 N avant le transfert sur des plaques de microtitration  
10 (Nunc). La densité optique est mesurée à 550 nm contre l'hydroxyde de sodium comme blanc.

Le comptage des cellules a été réalisé sur 4 puits de chaque plaque, en détachant les cellules avec la trypsine à 0,05%.

Nous avons étudié l'effet du fucose et du Mélange d'oligofucoses-1 (à 10  $\mu$ g/ml  
15 chacun) en présence ou en l'absence de l'ascorbate de sodium à 500  $\mu$ g/ml. Puis en présence et en absence de rétinol (10  $\mu$ g/ml).

## **b) Résultats**

### **20 b.1) Effets du fucose et du Mélange d'oligofucoses-1**

Nous avons constaté une diminution (environ 19%) de la quantité de collagène synthétisée par les fibroblastes en présence du fucose. Cette diminution est beaucoup plus importante avec les concentrations 1  $\mu$ g/ml et 10  $\mu$ g/ml qu'avec 100  $\mu$ g/ml. Le Mélange d'oligofucoses-1 n'a pas d'effet significatif à 10  $\mu$ g/ml. Ces  
25 résultats sont représentés à la Figure 1.

### **b.2) Effets du fucose et du Mélange d'oligofucoses-1 en présence d'ascorbate de sodium**

Nous avons constaté une augmentation de la quantité de collagène synthétisée par  
30 les fibroblastes. L'ascorbate de sodium provoque non seulement une disparition de l'inhibition attendue par le fucose mais il induit même une stimulation de la



biosynthèse de collagène. Le même effet stimulant de l'ascorbate est observé en présence du Mélange d'oligofucoses-1, mais la stimulation observée est plus faible.

L'ascorbate de sodium à 500 µg/ml n'active que très faiblement la synthèse du collagène par rapport à l'effet de 50 µg/ml. En ajoutant le fucose on note une  
5 augmentation de cette stimulation, plus modeste avec le Mélange d'oligofucoses-1. Ces résultats sont représentés à la Figure 2.

### **b.3) Effets du fucose et du Mélange d'oligofucoses-1 en présence de rétinol**

Le rétinol seul a un effet inhibiteur sur la synthèse du collagène. En présence de  
10 fucose cette inhibition est en grande partie levée, tandis qu'elle est non seulement levée mais il existe de plus une légère stimulation en présence du Mélange d'oligofucoses-1. Ces résultats sont représentés à la Figure 3.

### **c) Conclusion**

15 Le fucose libre exerce une légère inhibition sur la biosynthèse du collagène par les fibroblastes en cultures tandis que le Mélange d'oligofucoses-1 n'exerce pas cet effet.

En présence d'ascorbate de sodium à 500 µg/ml, l'inhibition par le fucose disparaît et l'on note même l'existence d'une stimulation plus forte en présence de fucose. En présence du Mélange d'oligofucoses-1, on retrouve aussi cette stimulation  
20 bien qu'un peu plus modeste.

Le rétinol seul à 10 µg/ml, inhibe la biosynthèse du collagène. Cette inhibition est complètement levée par l'addition du Mélange d'oligofucoses-1.

Ces résultats sont représentés aux Figures 1 à 3.

**Exemple 5 : crème anti-âge**

<b>Composant</b>	<b>% (en poids)</b>
Eau	q.s.p 100 %
Sodium benzoate	0,2
Disodium EDTA	0,08
Glycerin	2,00
Butylene Glycol	4,00
Carbomer ETD 2020	0,20
Ceteareth-20	1,00
Mineral Oil	3,00
Squalane	2,00
Octyl Palmitate	6,00
Shea Butter	2,50
Cetearyl Alcohol	1,00
Rosa AFF Rubiginosa Seed Oil	0,20
Decyl Oleate	0,50
Octyl Methoxycinnamate	5,00
Butyl Methoxy-dibenzoylmethane	0,50
BHA	0,01
Cyclomethicone	5,00
Cyclomethicone & Dimethiconol	2,00
Dimethicone	2,00
Fragrance (Crematest Feno)	0,09
Fragrance (Chemoderm)	0,09
Triethanolamine	0,30
2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	0,02
Mélange d'oligofucoses-I	0,50
Vitamin A	3,50
Vitamin C	1,00

**Exemple 6 : crème anti-âge**

<b>Composant</b>	<b>% (en poids)</b>
Eau	q.s.p 100 %
Sodium benzoate	0,2
Disodium EDTA	0,08
Glycerin	2,00
Butylene Glycol	4,00
Carbomer ETD 2020	0,20
Ceteareth-20	1,00
Mineral Oil	3,00
Squalane	2,00
Octyl Palmitate	6,00
Shea Butter	2,50
Cetearyl Alcohol	1,00
Rosa AFF Rubiginosa Seed Oil	0,20
Decyl Oleate	0,50
BHA	0,01
Cyclomethicone	5,00
Cyclomethicone & Dimethiconol	2,00
Dimethicone	2,00
Fragrance (Crematest Feno)	0,09
Fragrance (Chemoderm)	0,09
Triethanolamine	0,30
2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	0,02
Mélange d'oligofucoses-1	0,50
Vitamin A	3,50
Vitamin C	1,00

### Revendications

1. Composition cosmétique ou pharmaceutique caractérisé en ce qu'elle comprend au moins un composant vitamine choisi dans le groupe constitué par la  
5 vitamine C et ses dérivés, la vitamine A (ou rétinol) et ses dérivés, et les mélanges de ceux-ci, en association avec au moins un composant fucose choisi dans le groupe constitué par le fucose, les polysaccharides et oligosaccharides contenant du fucose, et les mélanges de ceux-ci, ainsi qu'au moins un excipient cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

10 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composant vitamine est choisi dans le groupe constitué par l'acide ascorbique, les sels et esters de ce dernier, le rétinol, les rétinoïdes autres que le rétinol, et les mélanges de ceux-ci.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le composant vitamine est choisi dans le groupe constitué par l'acide ascorbique, le  
15 sodium ascorbate, l'ascorbyl phosphate, l'ascorbyl palmitate, le rétinol, l'acide rétinoïque, le rétinaldéhyde, le rétinyl palmitate, et les mélanges de ceux-ci.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composant fucose est choisi dans le groupe constitué par le L-fucose, le D-fucose, sous forme alpha, beta ou d'un mélange de ces formes alpha et  
20 beta, les fucanes, les polysaccharides et oligosaccharides comprenant le motif de répétition fucose-galactose-acide galacturonique, et les mélanges de ceux-ci.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le composant fucose est un mélange d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose, comprenant des oligosaccharides de moins de 13 unités  
25 saccharidiques comprenant au moins une unité fucose en position terminale non réductrice, et en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant au moins une étape de dégradation d'un polysaccharide issu d'un microorganisme du genre *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*.

6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que le mélange  
30 d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose comprend, par rapport au poids total du mélange, au moins 15 % en poids d'oligosaccharides de moins de 13 unités

saccharidiques comprenant au moins une unité fucose en position terminale non réductrice.

7. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que le mélange d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose comprend, par rapport au poids total du mélange, de 20 à 50 % en poids d'oligosaccharides de moins de 13 unités saccharidiques comprenant au moins une unité fucose en position terminale non réductrice.

8. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que le mélange d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose comprend en outre, par rapport au poids total du mélange, de 25 à 45 % en poids d'oligosaccharides ayant de 13 à 24 unités saccharidiques comprenant au moins une unité fucose en position terminale non réductrice.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisée en ce que le mélange d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose comprend en outre, par rapport au poids total du mélange, de 15 à 35 % en poids d'oligosaccharides de plus de 54 unités saccharidiques comprenant au moins une unité fucose en position terminale non réductrice.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisée en ce que les oligosaccharides du mélange d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose comprennent, au moins en partie, le motif de répétition fucose-galactose-acide galacturonique.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisée en ce que le mélange d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose est susceptible d'être obtenu par le procédé comprenant les étapes consistant à :

- a) faire croître le microorganisme du genre *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* dans un milieu nutritif aqueux par fermentation aérobie d'une source de glucide assimilable;
- b) récupérer le polysaccharide formé à partir du moût de fermentation;
- c) soumettre le polysaccharide à une hydrolyse modérée;
- d) soumettre le produit d'hydrolyse de l'étape c) à une hydrolyse enzymatique; et
- e) désactiver l'enzyme puis récupérer le mélange d'oligosaccharides ainsi formé.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, caractérisée en ce que le microorganisme *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* est le microorganisme déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes sous le numéro I-1507, ou un mutant de ce dernier.

5           13. Composition selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce l'hydrolyse modérée, pour la préparation du mélange d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose, est réalisée par un traitement choisi dans le groupe constitué par les traitements aux rayons gamma, les traitements de protolyse et les combinaisons de ces traitements.

10           14. Composition selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'hydrolyse enzymatique, pour la préparation du mélange d'oligosaccharides non sulfatés à base de fucose, est réalisée avec au moins une endo-fucosidase

15           15. Mélange selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'endo-fucosidase est la Fermizyme HCP.

16           16. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration du composant fucose est comprise entre environ 0,001 et environ 20 % en poids, et en ce que la concentration en composant vitamine est comprise entre environ 0,001 et environ 90 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

20           17. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le rapport pondéral composant vitamine : composant fucose est compris entre environ 800 : 1 et environ 1 : 2.

25           18. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'elle comprend en outre un vecteur sous forme de microsphères renfermant le composant vitamine.

30           19. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'elle comprend en outre au moins un additif cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable, choisi dans le groupe constitué par les agents structurants de la peau, les agents humectants, les émoullients, les silicones, les agents de protection solaires, les émulsifiants, les épaississants, les agents séquestrants, les antioxydants, les fragrances, les conservateurs, et les mélanges de ceux-ci.

20. Utilisation, dans une composition cosmétique ou pharmaceutique, d'au moins un composant vitamine tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à

3, en association avec au moins un composant fucose tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 et 4 à 15, pour réduire les effets toxiques du composant vitamine.

21. Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que le rapport pondéral composant vitamine : composant fucose est compris entre environ 800 : 1 et  
5 environ 1 : 2 .

22. Méthode de traitement cosmétique de la peau, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau une composition cosmétique telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 19.

10

15

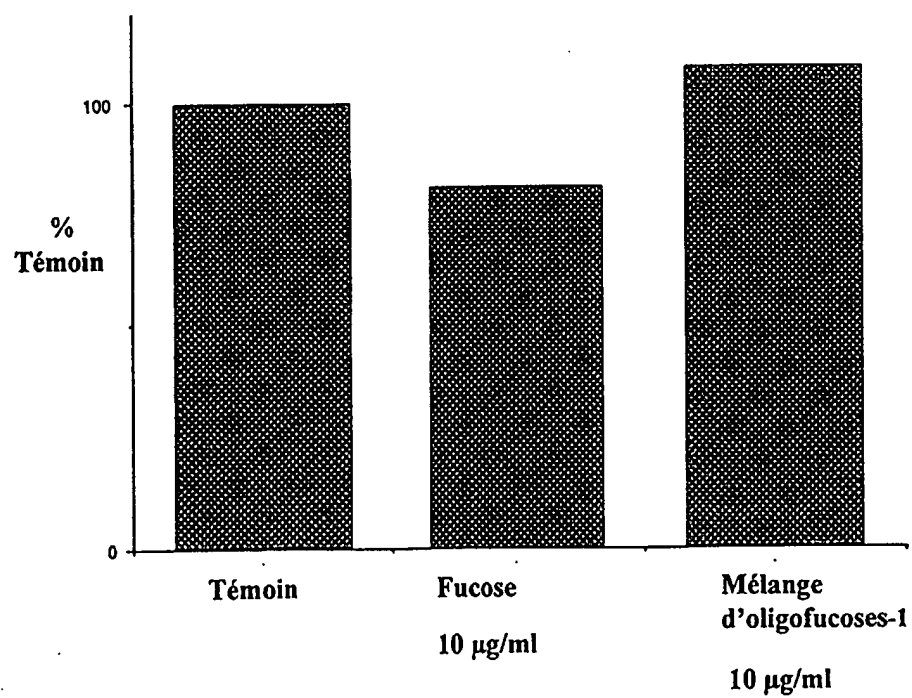
20

25

30

FIGURE 1/3

5



10

15



FIGURE 2/3

5

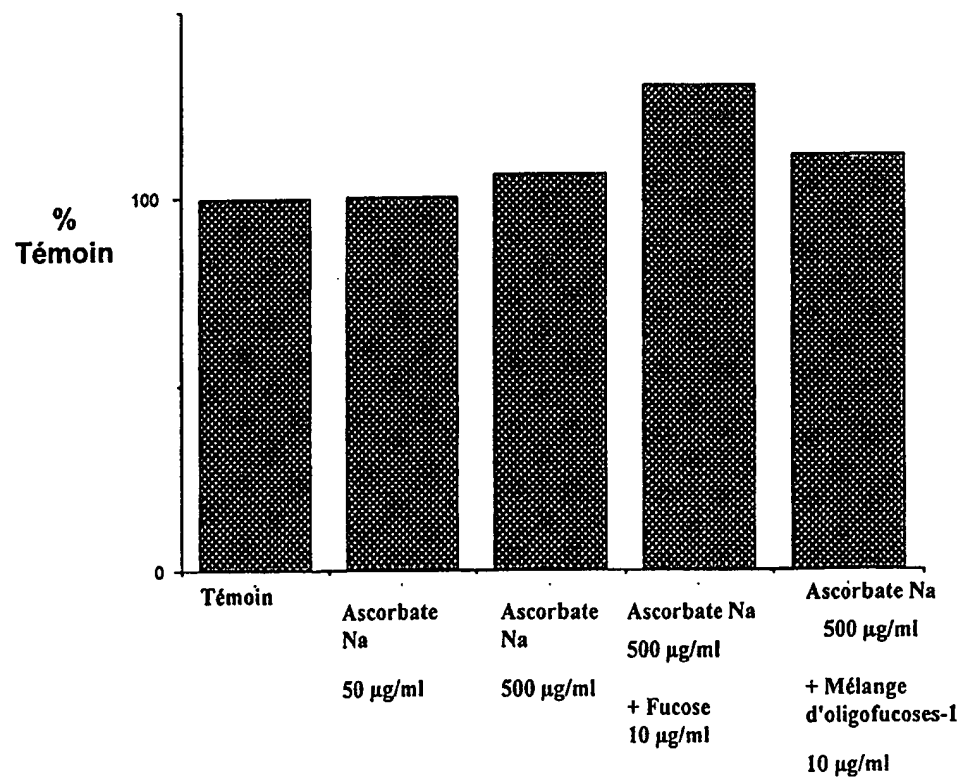
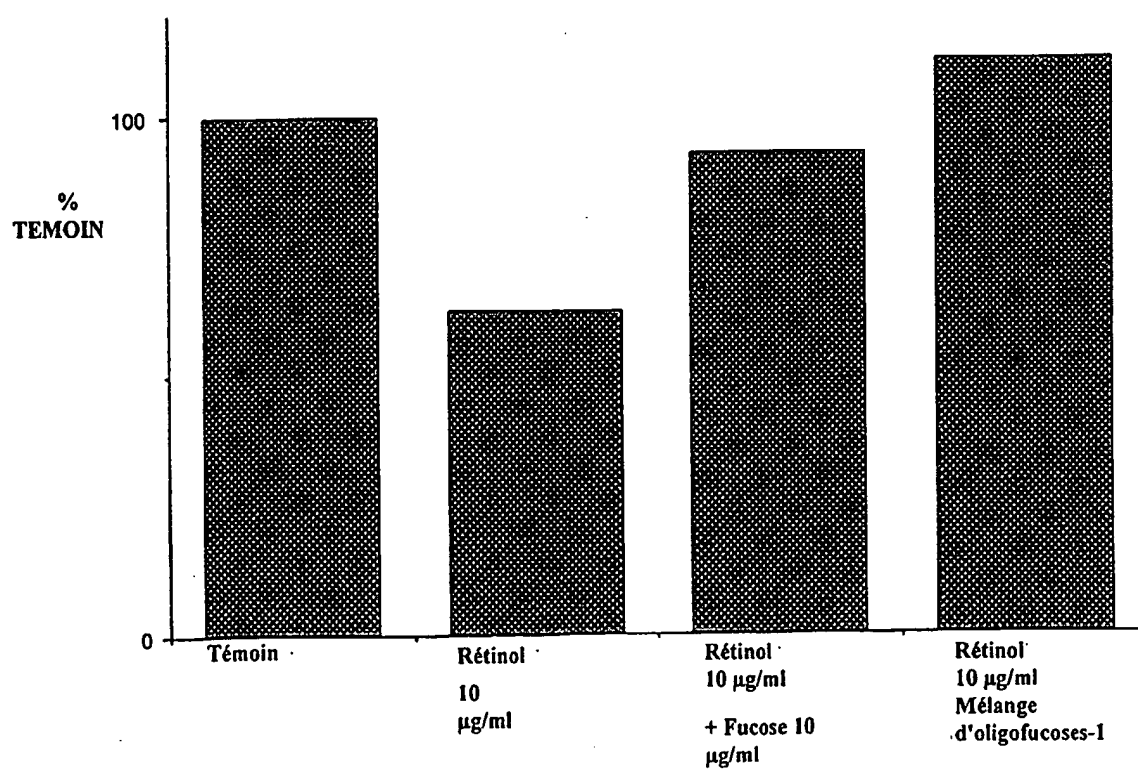


FIGURE 3/3

5





# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2813789

N° d'enregistrement  
national

FA 591370  
FR 0011546

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	FR 2 768 623 A (THOREL) 26 mars 1999 (1999-03-26) * le document en entier *	1-4, 16, 17, 19-22	A61K7/48 A61K31/375 A61P17/00
X	US 5 686 103 A (REDZINIAK ET AL.) 11 novembre 1997 (1997-11-11) * exemple 9 *	1-3, 16, 17, 19-22	
A	DE 198 23 552 A (HENKEL) 2 décembre 1999 (1999-12-02) * revendications 1,5,10 *	1-3, 16, 17, 19-22	
A	EP 0 610 511 A (SHISEIDO) 17 août 1994 (1994-08-17) * revendications 1,4,6 *	1-22	
A	DE 198 05 827 A (BEIERSDORF) 19 août 1999 (1999-08-19) * le document en entier *	1-22	
A	US 5 780 443 A (MAIER ET AL.) 14 juillet 1998 (1998-07-14) * le document en entier *	1-22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	EP 0 667 145 A (L'OREAL) 16 août 1995 (1995-08-16) * le document en entier *	1-22	A61K
A	EP 0 818 200 A (L'OREAL) 14 janvier 1998 (1998-01-14) * le document en entier *	1-22	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
25 juillet 2001		Fischer, J.P.	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**Composition used for cosmetic treatment of skin comprises vitamin C and/or vitamin A and fucose component**

**Patent number:** FR2813789  
**Publication date:** 2002-03-15  
**Inventor:** ROBERT LADISLAS; ROBERT ALEXANDRE MICHEL;  
ROBERT CATHERINE SYLVIE; GESZTESI JEAN LUC  
**Applicant:** IND E COM DE COSMETICOS NATURA (BR)  
**Classification:**  
- **international:** A61K7/48; A61K31/375; A61P17/00; A61K31/375;  
A61K31/07; A61K31/70  
- **european:** A61K8/60; A61K8/67C; A61K8/67H; A61K8/73;  
A61K31/70; A61Q19/08  
**Application number:** FR20000011546 20000911  
**Priority number(s):** FR20000011546 20000911

**Report a data error here**

**Abstract of FR2813789**

Composition comprises vitamin C, vitamin A and/or their derivatives and at least one fucose component comprising fucose, or a polysaccharide or oligosaccharide containing fucose and at least one excipient.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide